

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS BIODEGRADABLES CON LA INCORPORACIÓN DE UN AGENTE DE BIOCONTROL***

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**ALUMNO/A:** Belén Torregrosa Moreno

**TUTORA:** Lorena Atarés Huerta  
**COTUTORA:** Amparo Chiralt Boix

*Curso Académico: 2015/2016*

**VALENCIA, Junio 2016**



## Resumen

El control biológico es una de las alternativas más eficientes y prácticas a los fungicidas químicos para el control de enfermedades producidas por hongos en agricultura. Su aplicación práctica no ha tenido lugar en gran medida por la sensibilidad de los agentes de biocontrol (ABCs) a condiciones ambientales adversas, que dan lugar a variabilidad y poca reproducibilidad en los resultados. Se ha trabajado con el ABC *Candida sake*, una levadura efectiva en el control de enfermedades post-cosecha, así como de podredumbres de campo. Se seleccionaron ingredientes formadores de recubrimiento que previamente demostraron ser compatibles con este ABC, para ser utilizados como soporte del antagonista. Se utilizaron cuatro tipos de polímeros: el almidón de maíz (AM), la proteína de guisante (PG), la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y el caseinato sódico (NaCas). A cada uno de ellos se le añadió el ABC y se obtuvieron películas. Se caracterizaron sus propiedades físicas más relevantes y se compararon con las propiedades de las cuatro formulaciones sin adición del ABC. Para entender mejor los resultados obtenidos, se analizó la microestructura de las películas por microscopía óptica. Los resultados muestran que las películas de proteínas (NaCas y PG) presentaron peores propiedades barrera, tanto al vapor de agua como al oxígeno, coherentemente con una estructura más abierta y heterogénea, en comparación con las películas a base de polisacáridos (AM y HPMC). Las películas de HPMC presentaron los valores de humedad más bajos y, en general, las películas de proteínas presentaron los valores más altos de brillo y espesor. La incorporación del ABC dio lugar a un aumento de la humedad de las películas de NaCas y a un aumento del espesor en aquellas de HPMC. Además, en algunos casos tuvo un efecto significativo sobre las propiedades barrera de las películas. En general, aumentó ligeramente la PVA y la PO en las películas de polisacáridos y disminuyó estos valores en aquellas de proteínas. Las observaciones microscópicas corroboraron las diferencias encontradas en las propiedades físicas de las películas.

## Palabras clave:

Agente de biocontrol, antagonista, *Candida sake*, almidón de maíz, caseinato sódico, hidroxipropilmetilcelulosa, proteína de guisante

## Resum

El control biològic és una de les alternatives més eficients i pràctiques als fungicides químics per al control de malalties produïdes per fongs en agricultura. La seua aplicació pràctica no ha tingut lloc en gran mesura per la sensibilitat dels agents de biocontrol (ABCs) a condicions ambientals adverses, que donen lloc a variabilitat i poca reproductibilitat en els resultats. S'ha treballat amb l'ABC *Candida sake*, un llevat efectiu en el control de malalties post-collita, així com podridures de camp. Es varen seleccionar ingredients formadors de recobriments que prèviament van demostrar ser compatibles amb aquest ABC. Es van utilitzar quatre tipus de polímers: el midó de dacsa (AM), la proteïna de pèsol (PP), la hidroxipropilmetilcel·lulosa (HPMC) i el caseïnat sòdic (NaCas). A cada un d'ells se li va afegir l'ABC i es van obtenir pel·lícules. Es van caracteritzar les seues propietats físiques més rellevants i es van comparar amb les propietats de les quatre formulacions sense addició de l'ABC. Per a entendre millor els resultats obtinguts, es va analitzar la microestructura de les pel·lícules per microscopia òptica. Els resultats mostren que les pel·lícules de proteïnes (NaCas i PG) van tindre pitjors propietats barrera tant al vapor d'aigua com a l'oxigen, coherentment amb una estructura més oberta i heterogènia, en comparació amb les pel·lícules a base de polisacàrids (AM i HPMC). Les pel·lícules de HPMC van presentar els valors d'humitat més baixos i en general, les pel·lícules de proteïnes van presentar els valors més alts de brillantor i grossària. La incorporació de l'ABC va donar lloc a un augment de la humitat de les pel·lícules de NaCas i a un augment de l'espessor en aquelles de HPMC. A més, en alguns casos va tenir un efecte significatiu sobre les propietats barrera de les pel·lícules. En general, va augmentar lleugerament la PVA i la PO en les pel·lícules de polisacàrids i va disminuir aquests valors en aquelles de proteïnes. Les

observacions microscòpiques varen corroborar les diferències trobades en les propietats físiques de les pel·lícules.

### **Paraules clau:**

Agent de biocontrol, antagonista, *Candida sake*, midó de dacsa, caseinatsòdic, hidroxipropilmetilcel·lulosa, proteïna de pèsol

### **Abstract**

Biological control is one of the most efficient and practical alternatives to chemical fungicides to control fungal diseases in agriculture. Its practical application has not happened largely because of the sensitivity of the biological control agents (ABCs) to adverse environmental conditions, which results in poor reproducibility and variability in results. The ABC chosen was *Candida sake*, effective yeast in controlling postharvest diseases, as well as field rots. Film forming ingredients were chosen according to its compatibility with this ABC. Specifically, four types of polymers were selected: corn starch (AM), pea protein (PP), hydroxypropylmethycellulose (HPMC) and sodium caseinate (NaCas). The ABC was added to each one and films were obtained. After this, their most relevant physical properties were studied and compared with the properties of the four formulations without the addition of ABC. The results showed that protein films (NaCas and PG) had worse barrier properties both to water vapor and oxygen, coherently with a more open and heterogeneous structure, in comparison with films based on polysaccharides (AM and HPMC). HPMC films showed the lowest humidity values and in general protein films showed the highest brightness and thickness values. The incorporation of ABC resulted in an increase in the humidity of NaCas films and an increase in the thickness in those of HPMC. In addition, in some cases it had a significant effect on the barrier properties of the films. In general, the addition of ABC increased slightly the PVA and the PO in the films based on polysaccharides and decreased these values in those based on proteins. In order to understand better the results obtained, the microstructure of the film was analyzed by optical microscopy. Microscopic observations corroborated the differences found between the physical properties of the films.

### **Key words:**

Biocontrol agent, antagonist, *Candida sake*, corn starch, sodium caseinate, hydroxypropylmethycellulose, pea protein

# Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	10
3. Materiales y métodos .....	11
3.1. Preparación de las películas con ABC.....	11
3.1.1. Preparación de las dispersiones formadoras de películas .....	11
3.1.2. Preparación del inóculo de <i>Candida sake</i> .....	12
3.1.3. Inoculación de las DFP y obtención de las películas .....	12
3.2. Caracterización de las películas con el agente de biocontrol .....	12
3.2.1. Contenido en humedad .....	12
3.2.2. Espesor .....	13
3.2.3. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) .....	13
3.2.4. Permeabilidad al oxígeno (PO) .....	14
3.2.5. Propiedades ópticas .....	14
3.3. Microestructura de las películas con <i>Candida sake</i> .....	14
3.4. Análisis estadístico .....	14
4. Resultados y discusión .....	15
4.1. Caracterización de las películas con el agente de biocontrol y comparativa estadística de éstas con las películas sin el agente de biocontrol .....	15
4.1.1. Humedad .....	15
4.1.2. Espesor .....	16
4.1.3. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) .....	17
4.1.4. Permeabilidad al oxígeno (PO) .....	19
4.1.5. Propiedades ópticas.....	20
4.2. Propiedades estructurales de las películas con <i>Candida Shake</i> .....	21
5. Conclusiones .....	24
6. Bibliografía .....	25

# 1. Introducción

Las enfermedades de productos hortofrutícolas causan importantes pérdidas tanto en campo como en post-cosecha, que pueden llegar a representar un 25% del total de la producción en países industrializados, y más de un 50% en aquéllos en vías de desarrollo (Liu *et al.*, 2013). La creciente preocupación de los consumidores por los residuos de plaguicidas químicos en los alimentos y la seguridad ambiental, ha motivado el desarrollo de métodos no químicos para el control de estas enfermedades (Cañamás *et al.*, 2011). En los últimos años, se ha comprobado la efectividad de diversos microorganismos para este fin (Liu *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2009). Diversos agentes microbianos han demostrado reducir el deterioro de una amplia variedad de frutas (Roberts, 1990; Janisiewicz, 1994, 1998; Wilson y Wisniewski, 1994; Filonow *et al.*, 1996; Bull *et al.*, 1997; Chand-Goyal y Spotts, 1997; El-Ghaouth *et al.*, 1998). En este sentido, el control biológico utilizando levaduras, hongos y bacterias, ha sido considerado como un método realista deseable para el control de enfermedades de la fruta (Aloui *et al.*, 2015; Teixidó *et al.*, 1998). Así pues, el control biológico o biocontrol consiste en la utilización de microorganismos (agentes de biocontrol, ABCs o antagonistas) para controlar enfermedades en vegetales (Emmert y Handelsman, 1999) y reducir las pérdidas en los cultivos (Usall *et al.*, 2000). De ese modo se puede extender la vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos usando microflora natural (Gialamas *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2009).

Entre los antagonistas microbianos, las levaduras han sido objeto de especial atención, principalmente debido a su alta capacidad inhibitoria, la rápida colonización de las heridas de la fruta y los requerimientos nutricionales simples que les permiten colonizar superficies secas durante largos períodos de tiempo (Rosa-Magri *et al.*, 2011). Por otra parte, a diferencia de los hongos filamentosos, las levaduras no producen esporas alergénicas o micotoxinas, por lo que representan mayor interés para el consumo humano (Fan y Tian, 2000). En la última década, varios estudios científicos han demostrado la eficacia de las levaduras antagónicas como agentes de control biológico contra diversos hongos fitopatógenos (Bautista-Rosales *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Manso y Nunes, 2011; Platania *et al.*, 2012; Restuccia *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010).

El patógeno *Botrytis cinerea* es un hongo filamentoso de la familia *Sclerotiniaceae* que es capaz de infectar una amplia gama de huéspedes. Concretamente en las vides es responsable de la pudrición gris, que en muchas regiones templadas es la enfermedad fúngica más importante para este cultivo y que afecta ampliamente a la calidad del vino (Calvo-Garrido *et al.*, 2013). *Botrytis cinerea* es el patógeno dominante que causa la podredumbre en la mayoría de las regiones del mundo (Zahavi *et al.*, 2000).

En los últimos años, un gran número de estudios orientados a controlar la infección por *B. cinerea* en uva mediante el uso de levaduras antagónicas han sido publicados (Masih y Paul, 2002; Qin *et al.*, 2015; Raspor *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2012; Zahavi *et al.*, 2000). Concretamente, la levadura *Candida sake* ha demostrado un control efectivo contra la podredumbre provocada por *Botrytis* en uva, pero también frente a otros patógenos en otras frutas (Cañamás *et al.*, 2011; Calvo-Garrido *et al.*, 2013; Teixidó *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2006). La cepa CPA-1 fue aislada de la superficie de la manzana por el grupo de investigación de Patología de la Postcosecha del IRTA (Lleida). Por otro lado, se ha demostrado que la ingestión de las dosis aplicadas en biocontrol no presentan ningún peligro tóxico para la especie humana, puesto que la levadura no puede desarrollarse a temperaturas de 37°C, y es rápidamente destruida en contacto con el jugo gástrico (Hurley *et al.*, 1987; Usall *et al.*, 2000).

La supervivencia y en consecuencia la eficacia de los microorganismos antagonistas sobre la superficie del material vegetal está condicionada por una amplia gama de factores abióticos fluctuantes. El efecto de estos factores sobre la supervivencia del ABC ha sido evaluado en estudios de dinámica poblacional tras la aplicación en campo (Lima *et al.*, 2002; Longa *et al.*, 2007; Cañamás *et al.*, 2008). En general, el control biológico en campo ha sido inconsistente en comparación con los resultados obtenidos en condiciones controladas, como el invernadero o el laboratorio. Esto puede atribuirse, en parte, a la variabilidad de las condiciones ambientales y a la elevada sensibilidad de los ABCs (Cañamás *et al.*, 2011). Los factores ambientales que pueden influir en el comportamiento de los ABCs son la disponibilidad de agua, la distancia entre períodos de rocío, el tipo de cultivo, las lluvias, la luz ultravioleta, la temperatura y humedad ambientales, la presencia de materiales exudados sobre la superficie de la hoja, la presencia de otros competidores microbianos saprofitas y el tiempo entre aplicaciones (Calvo-Garrido *et al.*, 2014). Con el fin de mejorar la eficacia de los ABCs tanto aplicados en campo como en post-cosecha, diversas estrategias han sido estudiadas. Las investigaciones se han centrado en la mejora del proceso de formulación, el uso de combinaciones de varios ABCs, en la manipulación fisiológica de los antagonistas para aumentar su resistencia y en su aplicación en combinación con distintos tipos de sustancias (Elmer y Reglinski, 2006; Nunes, 2012; Sharma *et al.*, 2009).

La aplicación conjunta de ABCs con recubrimientos comestibles (RCs) parece ser una prometedora estrategia para disminuir la sensibilidad de los antagonistas y mejorar su persistencia y supervivencia en condiciones prácticas. En este sentido, existen pocos estudios basados en la incorporación de ABCs en RCs. Recientemente Marín *et al.* (2016) demostraron que es posible mejorar la adhesión y posterior supervivencia y eficacia frente a *B. cinerea* del ABC *C. sake*, mediante su aplicación conjunta con diferentes agentes formadores de RC.

Estudios similares de aplicación de recubrimientos comestibles con agentes de biocontrol se muestran en la Tabla 1.

Las películas y recubrimientos comestibles se han estudiado ampliamente en los últimos años, principalmente para su aplicación sobre sistemas alimentarios, debido a su potencial para proporcionar una barrera contra el transporte de materia, vehiculizar agentes activos y mejorar la integridad mecánica de los alimentos recubiertos. Las películas comestibles también pueden reducir y simplificar los materiales de embalaje necesarios para la protección de los productos alimenticios, limitando residuos domésticos contribuyendo así a reducir al mínimo la contaminación del medio ambiente. Las películas y los recubrimientos comestibles ofrecen numerosas ventajas frente a los envases convencionales debido a su biodegradabilidad, y se han utilizado para proteger a los ingredientes farmacéuticos y extender la vida útil de los productos alimenticios (Choi y Han., 2001). Una película o recubrimiento comestible se define como una capa delgada de material formado por compuestos comestibles que actúa como una barrera entre el alimento y el entorno (reduciendo el intercambio de compuestos tales como humedad, oxígeno, gases o aromas), o bien entre partes de un mismo alimento, por ejemplo entre compartimentos de diferentes actividades de agua. En ambos casos, la aplicación de los mismos tiene como objetivo la protección del producto y la prolongación de su vida útil, con la ventaja de poder consumirse como parte del alimento (Jiménez *et al.*, 2010; Zúñiga *et al.*, 2012). Los RCs son capas delgadas de material formadas directamente sobre la superficie del producto alimenticio, con lo que se convierten en una parte integral del alimento. Por otra parte, las películas comestibles (PCs) se forman por separado de cualquier uso eventual previsto y pueden aplicarse como cubiertas, envolturas, capas de separación, cápsulas y bolsas. Estas películas independientes también se utilizan como pruebas de estructuras para la determinación de propiedades barrera, propiedades mecánicas, solubilidad y otras propiedades (Kowalczyk *et al.*, 2011).

Las PCs se pueden obtener a partir de numerosos materiales que se encuentran en la mayoría de los casos en muchos productos de desecho de la pesca, la agricultura o la ganadería (López de Lacey *et al.*, 2012). Los principales componentes utilizados en la producción de PCs y RCs son proteínas (colágeno, caseína, proteína de suero, proteína de soja, gluten, zeína), polisacáridos (celulosa, almidón, quitosano), y lípidos (aceites esenciales, ceras) (Kowalczyk *et al.*, 2011).

El desarrollo de PCs se ha centrado fundamentalmente en la utilización de polisacáridos tales como la celulosa, el almidón y sus derivados, y proteínas (Rodríguez *et al.*, 2006). Los polisacáridos y las proteínas son buenos materiales de formación de película, pero presentan una barrera pobre contra la humedad debido a su naturaleza hidrófila. Por otro lado, lípidos tales como ácidos grasos, ceras naturales, agentes tensoactivos y resinas (Villalobos *et al.*, 2005)

proporcionan una mejor barrera a la humedad debido a su naturaleza apolar. En cambio, los lípidos presentan propiedades mecánicas menos eficaces y propiedades sensoriales indeseables (Fabra *et al.*, 2008). Además, los lípidos forman películas frágiles y requieren disolventes o altas temperaturas para fundirse, por lo que se suelen incorporar en la matriz hidrocoloide cuando se desea crear una barrera contra el agua (Pérez-Gago y Krochta, 2001; Villalobos *et al.*, 2005).

Existe un gran número de proteínas que se utilizan para la producción de películas y recubrimientos comestibles (Fabra *et al.*, 2008). Las proteínas son adecuadas para formar biopelículas debido a su alta plasticidad y elasticidad (Arrieta *et al.*, 2013). En general las películas proteicas tienen buenas propiedades mecánicas y de barrera contra aromas y gases tales como oxígeno o dióxido de carbono (Sánchez-González *et al.*, 2014). Además, son abundantes en la naturaleza y totalmente renovables, ya que se pueden obtener de plantas (zeína de maíz, gluten de trigo, soja o girasol) y fuentes animales (gelatina, queratina, caseína o suero de leche) (Arrieta *et al.*, 2013).

Debido a su excelente valor nutricional y a sus numerosas propiedades funcionales, tales como su solubilidad en agua y la capacidad de actuar como emulsionantes, el uso de proteínas de la leche (caseína y proteínas del suero), para formar películas comestibles se ha estudiado ampliamente. Los caseinatos comerciales como el caseinato de sodio (NaCas) tienen una estabilidad térmica satisfactoria y pueden formar fácilmente películas de soluciones acuosas debido a su naturaleza espiral aleatoria y a su capacidad para formar puentes de hidrógeno y enlaces electrostáticos e hidrófobos (Fabra *et al.*, 2008). Además, debido al alto número de grupos polares en su estructura, los caseinatos también muestran buena adhesión a diferentes sustratos haciéndolos una excelente barrera contra sustancias no polares, tales como oxígeno, dióxido de carbono y aromas (Arrieta *et al.*, 2013). Además son incoloros, sin sabor y elevan el valor nutricional de los alimentos (Sánchez-González *et al.*, 2013).

Por otra parte, las semillas de leguminosas son fuentes baratas de proteína con un valor nutritivo relativamente alto, lo que les convierte una muy buena materia prima para la producción de preparados a base de proteínas (Kowalczyk *et al.*, 2011). El aumento de la utilización de proteínas de leguminosas en la industria de alimentos ha conducido a la investigación de la funcionalidad de las leguminosas y proteínas de semillas. Los guisantes han recibido una atención especial debido a su alto valor nutricional. En comparación con otras leguminosas, los guisantes son ricos en hidratos de carbono y fibras y bajos en lípidos. La proteína de guisante se ha utilizado experimentalmente como un extensor cárnico de salchichas y como fortificante proteico del pan. Una vez concentrada y aislada, mantiene su calidad nutricional y tiene potencial como fortificante proteico de la dieta (Choi y Han., 2001). Los estudios realizados por



Choi y Han (2001, 2002) demostraron que las proteínas de guisante pueden ser utilizadas para preparar películas comestibles con permeabilidad al vapor de agua y características físicas similares a las obtenidas a partir de proteínas de soja, proteínas de suero o zeína. Además el guisante, a diferencia de la soja y otros alimentos (cereales con gluten, huevos, pescado, cacahuetes, leche, altramuza y productos derivados) no está en la lista de productos que son la causa de alergia e intolerancia alimentaria (Kowalczyk *et al.*, 2011).

Por otro lado, los polisacáridos obtenidos a partir de biopolímeros naturales representan un importante grupo de materiales para la formulación de películas y recubrimientos comestibles. Entre ellos, el almidón es uno de los materiales más prometedores para la fabricación de plásticos biodegradables. Este polímero es un recurso renovable de bajo coste, fácilmente disponible y con características termoplásticas que le permiten ser procesado fácilmente usando métodos convencionales de polímeros sintéticos (Ortega-Toro *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha comprobado que es completamente biodegradable en suelo y agua, lo que desde el punto de vista ambiental presenta una gran ventaja (Jiménez *et al.*, 2012). Por otro lado, el almidón presenta peores características físicas que los polímeros sintéticos. Sus principales puntos débiles son su naturaleza altamente hidrofílica, lo que lo convierte en una pobre barrera al vapor de agua, y el hecho de que se somete a procesos de retrogradación, lo que implica que sus propiedades mecánicas varían a lo largo del tiempo. Sin embargo, sus propiedades se pueden modificar mediante la adición de pequeñas cantidades de compuestos químicos (Ortega-Toro *et al.*, 2014). En general, el potencial de almidón como material para películas comestibles y para biomateriales ha sido ampliamente reconocido. Es un material apropiado para formar matrices y proporciona una buena barrera contra el oxígeno y dióxido de carbono (Rodríguez *et al.*, 2006).

Los derivados de la celulosa son compuestos formadores de película de interés, ya que son inodoros, insípidos, biodegradables y de bajo coste (Romano *et al.*, 2014). La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) es un hidrocoloide común utilizado en la formulación de matrices debido a sus buenas propiedades filmógenas, ya que forma películas transparentes, flexibles, con características sensoriales adecuadas y con una permeabilidad al oxígeno moderada. Sin embargo, las películas de HPMC presentan malas propiedades barrera al vapor de agua, debido a su naturaleza altamente hidrofílica (Pastor *et al.*, 2010). Debido a sus propiedades como agente formador de película se ha utilizado en diversas aplicaciones farmacéuticas y alimentarias (Romano *et al.*, 2014).

Debido a la fragilidad inherente de muchos biopolímeros, la adición de plastificantes es indispensable para obtener películas con cierta flexibilidad (Arrieta *et al.*, 2013). Estos agentes reducen las fuerzas de cohesión en las películas limitando las fuerzas de interacción entre cadenas, mejorando así la flexibilidad, elongación y tenacidad de las películas (Jiménez *et al.*,

2012). La adición de plastificantes a las películas y recubrimientos biodegradables generalmente aumenta su permeabilidad al oxígeno, vapor de agua y solutos. Los plastificantes comestibles más comunes son polioles, mono / di- u oligo-sacáridos, lípidos, y sus derivados (Choi y Han., 2001). Diferentes polioles se han utilizado en la formación de películas comestibles, tales como glicerol, xilitol y sorbitol (Jiménez, *et al.*, 2012). En la Tabla 2 se da una visión general de estudios recientes donde se han aplicado recubrimientos comestibles para la mejora de la calidad post-cosecha de diferentes frutas.

**Tabla 1: Recubrimientos comestibles con ABC utilizados en diferentes frutas para el control de patógenos**

<b>RC</b>	<b>ABC</b>	<b>Producto</b>	<b>Patógeno</b>	<b>Referencia</b>
<b>Quitosano (glicolquitosano, carboximetilquitosano)</b>	<i>Candida saitoana</i> <i>Nakase &amp; Suzuki</i>	Manzanas, cítricos	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium digitatum</i>	El Ghaouth <i>et al.</i> , 2000b
<b>Alginato</b>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Fresas, manzanas, kiwis, uvas de mesa, peras	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium digitatum</i>	Fan <i>et al.</i> , 2009
<b>Goma laca, éster de sacarosa, celulosa (metilcelulosa, hidroxipropil celulosa)</b>	<i>Candida oleophila</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>van Hall</i>	Uva, cítricos	<i>Penicillium digitatum</i> Sacc. (podredumbre verde) y <i>Penicillium italicum</i> Wehmer (podredumbre azul)	McGuire, 2000
<b>Cera, goma laca, celulosa</b>	<i>Candida oleophila montrocher</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (Jorgensen) Harrison, <i>Cryptococcus albidus</i> (Saito) Skinner	Uva, cítricos	<i>Penicillium digitatum</i> Sacc. (podredumbre verde) y <i>Penicillium italicum</i> Wehmer (podredumbre azul)	McGuire y Baldwin, 1994
<b>Metilcelulosa</b>	<i>Candida guilliermondii</i>  <i>Debaryomyces</i> sp. strain 230	Naranjas, piña	<i>Penicillium digitatum</i> Sacc. (podredumbre verde) y <i>Penicillium italicum</i> Wehmer (podredumbre azul)	Potjewijd <i>et al.</i> , 1995
<b>Alginato de sodio (NaAlg)</b>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Naranjas	<i>Penicillium digitatum</i> Sacc. (podredumbre verde)	Aloui <i>et al.</i> , 2015
<b>Goma garrofin (LBG)</b>				
<b>Quitosano</b>	<i>Candida sake CPA-1</i>	Uva	<i>Botrytis cinerea</i>	Calvo-Garrido <i>et al.</i> , 2013
<b>Aditivos (sales de calcio): propionato de calcio, bicarbonato de calcio, EDTA</b>	Aspire ( <i>Candida oleophila</i> )	Manzana, melocotón	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i>	Droby <i>et al.</i> , 2003

<b>Aditivo:</b>	<b>2-Deoxy-D-glucosa</b>	<i>Candida saitoana</i> Nakase & Suzuki	Manzana, cítricos	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i>	El Ghaouth <i>et al.</i> , 2000a; 2001
<b>Goma laca/ ésteres de sacarosa</b>		<i>Candida oleophila</i>	Uva	<i>Penicillium digitatum</i> Sacc. (podredumbre verde) <i>Penicillium italicum</i> Wehmer (podredumbre azul)	McGuire y Dimitriglou, 1999
<b>Base nitrogenada de levadura, solución salina tamponada con fosfato, glucosa</b>		<i>Wickerhamomyces anomalus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva de mesa	<i>Botrytis cinerea</i>	Parafati <i>et al.</i> , 2015
<b>CMC-Na</b>		<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	Azufaifa	<i>Alternaria alternata</i>	Wang <i>et al.</i> , 2011
<b>HPMC AM NaCas PG</b>		<i>Candida sake</i> CPA-1	Uva	<i>Botrytis cinerea</i>	Marín <i>et al.</i> , 2016

NaAlg: alginato de sodio, LBG: goma garrofin, CMC-Na: carboximetilcelulosa sódica, HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa, AM: almidón de maíz, NaCas: caseinato sódico, PG: proteína de guisante, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

**Tabla 2: Recubrimientos comestibles utilizados en frutas**

<b>Componentes</b>	<b>Referencia</b>
NaCas, CaCas y carvacrol	Arrieta <i>et al.</i> , 2013
PG, proteína de soja, gluten de trigo, proteína de maíz (zeína), colágeno y gelatina	Choi y Han, 2001
NaCas+ mezcla ácido oléico-cera de abeja.	Fabra <i>et al.</i> , 2008
Proteína de soja+ ácidos grasos	Fabra <i>et al.</i> , 2008
HPMC+ ácidos grasos	Jiménez <i>et al.</i> , 2010
AM +ácidos grasos	Jiménez <i>et al.</i> , 2012
AM+ glicerol+ tensoactivo	Ortega-Toro <i>et al.</i> , 2014
Almidón de patata+ glicerol+ tensoactivo	Ortega-Toro <i>et al.</i> , 2014
Almidón de kudzu+ tensoactivo+ ácido cítrico	Ortega-Toro <i>et al.</i> , 2014
HPMC+ própolis	Pastor <i>et al.</i> , 2010
Proteína de suero+ cera de abeja	Pastor <i>et al.</i> , 2011
Almidón de patata+ plastificante (glicerol)+ tensoactivo	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006
HPMC+ aceite esencial de árbol de té	Sánchez-González <i>et al.</i> , 2009
HPMC+ tensoactivo	Villalobos <i>et al.</i> , 2005
NatureSeal (carboximetilcelulosa), ácido cítrico y alginato	Villalobos <i>et al.</i> , 2009
Goma xantana y acetato alfa-tocoferol (vitamina E)	Villalobos <i>et al.</i> , 2009
Curcuma / caseína almidón + alcohol de polivinilo + polietilenglicol	Villalobos <i>et al.</i> , 2009
HPMC+ dodecil sulfato sódico	Zúñiga <i>et al.</i> , 2012

NaCas (Caseinato sódico), CaCas (Caseinato cálcico), PG (Proteína de guisante), HPMC (Hidroxipropilmetilcelulosa), AM (Almidón de maíz).

## 2. Objetivos

La naturaleza de las matrices utilizadas para la obtención de películas comestibles (PCs), así como la adición del ABC *Candida sake*, son determinantes tanto en la estructura resultante como en las propiedades fisicoquímicas de la película. El objetivo general de este trabajo fue la caracterización de películas biodegradables elaboradas con cuatro materiales diferentes (almidón de maíz, caseinato sódico, hidroxipropilmetilcelulosa y proteína de guisante) con la incorporación del ABC *Candida sake* y la posterior comparación de las mismas con resultados previos del grupo de investigación, para esclarecer el efecto de la incorporación del ABC sobre las propiedades de las películas.

A fin de alcanzar el objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Diseño y obtención por *casting* de las formulaciones de las películas con materiales de base, plastificantes y ABC.
- Caracterización de las películas biodegradables en términos de espesor, humedad, propiedades ópticas y propiedades barrera (permeabilidad al vapor de agua y permeabilidad al oxígeno).
- Observación de la microestructura de las películas.
- Comparación de los resultados con otros obtenidos previamente para películas sin ABC incorporado.

Para llevar a cabo los objetivos establecidos, se estableció el siguiente plan de trabajo:

1. Diseño de las dispersiones formadoras de películas (DFP) con adición del ABC *Candida sake*, en base a estudios anteriores y pruebas previas.
2. Obtención de las películas con el ABC *Candida sake*.
3. Caracterización de sus propiedades ópticas, espesor y propiedades barrera al vapor de agua y al oxígeno (PVA y PO).
4. Determinación de la humedad de las películas con ABC, por considerarse la propiedad que puede influir de una manera más directa en la viabilidad del mismo.
5. Análisis microestructural de las películas a fin de observar la distribución de la levadura sobre éstas.
6. Análisis estadístico para determinar la comparativa de las propiedades citadas anteriormente de las películas con ABC y sin ABC.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Preparación de las películas con ABC

#### 3.1.1. Preparación de las dispersiones formadoras de películas

El almidón de maíz (AM) y la proteína de guisante (PG) fueron suministrados por Roquette Laisa España, S.A. (Valencia, España). La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y el caseinato sódico (NaCas) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El glicerol, empleado como plastificante, fue suministrado por Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España).

El NaCas y la PG (4% p/p) fueron dispersados en agua desionizada, agitándose hasta su completa disolución a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. El AM (2% p/p) se dispersó en agua desionizada y se gelatinizó en un baño termostático a 95°C durante 30 minutos, agitando cada 5 minutos aproximadamente para promover su gelatinización, y transcurrido dicho tiempo se enfrió hasta temperatura ambiente. HPMC (2% p/p) se dispersó en agua desionizada, se calentó en agitación hasta 80°C durante 15 min y se mantuvo en agitación toda la noche.

En el caso de las dispersiones formadoras de películas (DFP) de AM y de proteínas, se añadió glicerol como plastificante en una proporción másica de polímero:glicerol 1:0,25. Las concentraciones de biopolímeros, así como la proporción polímero:glicerol, se seleccionaron en base a estudios previos (Sánchez-González *et al.*, 2009, 2013; Jiménez *et al.*, 2012). Las dispersiones se homogeneizaron durante 4 minutos a 13600 rpm con un rotor stator Ultraturrax (DI25, Janke and Kunkel, Alemania) y se esterilizaron para reducir su carga microbiana. En los casos en los que fue necesario se desgasificaron a vacío mediante una bomba (MZ 2C NT, Vacuubrand GMBH + CO KG, Wertheim, Alemania), a temperatura ambiente.

#### 3.1.2. Preparación del inóculo de *Candida sake*

La cepa de la levadura *Candida sake* empleada fue aislada de la superficie de manzanas por el centro UdL-IRTA (Lleida, España) y fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT-10817) en la Universidad de Valencia (Burjassot, España).

El proceso que se llevó a cabo para la producción celular y la formulación fue descrito por Cañamás *et al.* (2011). Se partió de una triple estría de *Candida sake* incubada a 25°C durante 48h en medio tripticasa-soja agar (TSA) (Scharlab, Barcelona, España), y se preparó una suspensión de células en agua estéril cuya concentración se determinó por conteo con Cámara

Thoma. Se determinó el volumen de suspensión necesario para inocular una concentración en medio líquido de crecimiento para la levadura de  $10^4$  UFC/ml. El medio líquido se realizó mediante la mezcla de agua desionizada con una composición de 40 g/L de melazas y 1,2 g/L de urea. A continuación se incubó durante 48 h a 25°C a 150 rpm de agitación y las células se separaron del medio por centrifugación durante 10 minutos a 8631 xg a 10°C. Para finalizar, se eliminó el sobrenadante y se recuperó la pasta de células con el mismo volumen de agua estéril necesario para obtener la suspensión de trabajo, cuya concentración se determinó por Cámara Thoma.

### ***3.1.3. Inoculación de las DFP y obtención de las películas***

Una vez conocida la concentración de la suspensión de células se determinó el volumen necesario para la inoculación de las DFP en una concentración final de  $5 \cdot 10^7$  UFC/película, lo cual equivaldría a  $2,83 \cdot 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> (proporción g sólidos formadores de película:UFC de 1: $5 \cdot 10^7$  UFC). A continuación, las DFP con el inóculo fueron agitadas a 150 rpm durante 10 minutos para conseguir una distribución homogénea del microorganismo.

Tras la inoculación, las dispersiones formadoras de película (DFP) se vertieron sobre placas de teflón de 15cm de diámetro, colocadas sobre una superficie nivelada. Se pesó la cantidad necesaria de cada formulación para conseguir una densidad superficial de sólidos constante (5,6 mg/cm<sup>2</sup>) en todas las películas, lo que equivale a 1 g de sólidos por película. Las DFP se secaron durante 24-48 h a una humedad relativa del 45%, y se retiraron de las placas con una espátula. Previamente a la caracterización, las películas se acondicionaron durante una semana a 25°C en desecadores de vidrio que contenían una disolución sobresaturada de nitrato de magnesio (Panreac Química S.L.U. Barcelona, España) a una humedad relativa (HR) del 53%.

## **3.2. Caracterización de las películas con el ABC**

### ***3.2.1. Contenido en humedad***

El contenido en humedad se determinó mediante un método gravimétrico utilizando una balanza analítica (ME36S, Sartorius, Alemania). Las muestras se cortaron en pequeños fragmentos, se depositaron en crisoles de vidrio y se secaron en una estufa de convección a 60°C durante 24 h para eliminar el agua más accesible y superficial. Posteriormente se introdujeron en una estufa de vacío a la misma temperatura. Por último, los crisoles permanecieron en un desecador con pentóxido de fósforo (Panreac Química, S.A. Castellar de Vallés, Barcelona) durante 15 días, hasta masa constante. Los fragmentos de película totalmente deshidratados se pesaron y se calculó el contenido de humedad de las películas en base seca (g agua/ 100 g película seca).



### 3.2.2. Espesor

El espesor de las películas se determinó utilizando un micrómetro electrónico digital modelo Palmer (Comecta, Barcelona, España) con una precisión de 0,001 mm. Se tomaron valores aleatoriamente en seis puntos de cada película y en cuatro películas por formulación. Éstos se utilizaron posteriormente para cuantificar las propiedades barrera al vapor de agua y al oxígeno.

### 3.2.3. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Para la determinación de la PVA se utilizó una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (McHugh *et al.*, 1993) para un gradiente de humedad relativa 53-100% y una temperatura de 25°C. Para cada formulación se recortaron 4 muestras circulares de 3,5 cm de diámetro, seleccionando películas sin defectos visibles. Estas muestras se acoplaron sobre copas de aluminio de 3,5 cm de diámetro (Payne, Elcometer SPRL, Hermelle /s Argenteau, Bélgica) en cuyo interior se habían depositado 5 ml de agua destilada (HR 100%). La cara de la película en contacto con el aire durante el secado se colocó hacia el ambiente y para asegurar la hermeticidad del sistema, se colocó un anillo de caucho y dos mordazas. Las copas se introdujeron en un soportes con un ventilador, y éstos en desecadores de vidrio equilibrados con soluciones sobresaturadas de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  (53% HR). Los desecadores se almacenaron en una cámara Hotcold UL (JP Selecta, Barcelona, España) y se monitorizó la masa de las copas con las películas con una balanza analítica (ME36S Sartorius, Alemania) a intervalos de 1,5 h durante 24 h. La pendiente de la representación de la pérdida de masa frente al tiempo se dividió entre el área expuesta para calcular la velocidad de transferencia del vapor de agua (VTVA). La presión de vapor de agua en la cara interior de la película ( $p_2$ ) se obtuvo con el método propuesto por McHugh *et al.* (1993) para corregir el efecto de gradientes de concentración establecidos en el espacio de cabeza de la copa (ecuación 1).

$$VTVA = \frac{P \cdot D \cdot \ln\left[\frac{(P-p_2)}{(P-p_1)}\right]}{R \cdot T \cdot \Delta z} \quad (1)$$

Donde P = presión total (atm), D = difusividad del agua en aire a 25°C ( $\text{m}^2/\text{s}$ ), R = constante de los gases ( $82,057 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ atm kmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), T = temperatura (K),  $\Delta z$  = altura media del espacio de cabeza (m), considerando su altura inicial y final,  $p_1$  = presión de vapor de agua en la superficie de la solución (atm),  $p_2$  = presión de vapor corregida en la cara interior de la película.

Utilizando la ecuación 2, la PVA se calculó a partir de  $p_2$  la presión de vapor de agua en la cara exterior de la película ( $p_3$ ) y el espesor (e).

$$PVA = \frac{VTVA}{(p_2 - p_3)} \cdot e \quad (2)$$

#### **3.2.4. Permeabilidad al oxígeno (PO)**

Para determinar la permeabilidad al oxígeno de las películas a 25°C y 53% HR, se utilizó un equipo Ox-Tran modelo 2/21 ML Mocon (Lippke, Neuwied, Alemania), siguiendo el método estándar D3985-95 (ASTM, 2002). Se realizaron cuatro repeticiones por formulación, con un área de exposición al flujo de oxígeno de 50 cm<sup>2</sup>. La tasa de transferencia de oxígeno (OTR) se transformó en OP (ecuación 3) teniendo en cuenta el gradiente de presión de oxígeno a ambos lados de la película (p<sub>O2</sub>) y el espesor (e) de la misma.

$$OP = \frac{OTR}{p_{O2}} \cdot e \quad (3)$$

#### **3.2.5. Propiedades ópticas**

El brillo de las películas se midió con un brillómetro (Multi-Gloss 268, Konica Minolta, Langenhagen, Alemania) a 20°, 60° y 85° de acuerdo con la norma ASTM D523 (1999) en 3-5 películas de cada formulación y tomando 6 medidas en la cara de cada película expuesta al ambiente durante el proceso de secado.

### **3.3. Microestructura de las películas con *Candida sake***

A fin de estudiar la estructura a nivel microscópico de las películas, pequeños fragmentos de éstas fueron depositados sobre portaobjetos. Con un microscopio óptico (B-350 Optika) se capturaron imágenes con los objetivos de 10x y 40x con la ayuda de una cámara Optika 4083.B5. Se tomaron imágenes para estudiar las posibles diferencias en la estructura y densidad de las células de *Candida sake*.

### **3.4. Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA con un nivel de significación del 95% y utilizando para las comparaciones múltiples el test LSD. Los cálculos se realizaron con el Software STATGRAPHICS Centurion XVI (Versión 16.2.04).

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Caracterización de las películas con el agente de biocontrol y comparativa estadística de éstas con las películas sin el agente de biocontrol

La Tabla 3 recoge los resultados del análisis de las propiedades físicas de las películas con la incorporación del ABC en términos de humedad, espesor, PVA, PO y brillo a 60°.

**Tabla 3.** Contenido en humedad (g agua / 100 g película seca), espesor ( $\mu\text{m}$ ), permeabilidad al vapor de agua ( $(\text{g}/\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m})\cdot 10^{11}$ ), permeabilidad al oxígeno ( $\text{cm}^3\cdot\text{mm}/\text{m}^2\text{atm}\cdot\text{día}$ ) y brillo a 60° de las películas con ABC incorporado. Valores medios y desviaciones estándar entre paréntesis.

Formulación	Humedad (g agua / 100 g película seca)	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	PVA ( $\text{g}/\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m})\cdot 10^{11}$	PO ( $\text{cm}^3\text{mm}/\text{m}^2\text{atm}\cdot\text{día}$ )	Brillo 60°
AM	8,9(0,2) <sup>AB</sup>	46 (2) <sup>A</sup>	138 (6) <sup>A</sup>	1,36 (0,10) <sup>A</sup>	15(4) <sup>A</sup>
NaCas	10,1(0,6) <sup>B</sup>	62 (4) <sup>B</sup>	175 (4) <sup>B</sup>	2,8 (0,3) <sup>B</sup>	20 (7) <sup>A</sup>
HPMC	4,4 (0,6) <sup>C</sup>	51(2) <sup>A</sup>	80,6 (1,7) <sup>C</sup>	>ld	21 (8) <sup>A</sup>
PG	8,5(1,7) <sup>A</sup>	50 (4) <sup>A</sup>	146 (7) <sup>A</sup>	4,12 (0,04) <sup>C</sup>	42(11) <sup>B</sup>

A-C: diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre polímeros ( $p < 0,05$ ). HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa, PG: proteína de guisante, AM: Almidón de maíz, NaCas: caseinato de sodio, >ld: superior al límite de detección.

#### 4.1.1. Humedad

El contenido de humedad puede proporcionar información sobre las propiedades barrera de las películas, ya que el agua actúa como plastificante y su presencia en mayor proporción puede favorecer el transporte de agua a través de la película, aumentando la permeabilidad.

El contenido de humedad de las películas tras su acondicionamiento a 53% HR (g agua / 100 g película seca) se recoge en la Tabla 3. Las películas de HPMC presentaron un contenido en agua significativamente menor que el resto ( $p < 0,05$ ). En promedio, las películas a base de NaCas presentaron una cierta tendencia hacia humedades más elevadas, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Resultados similares fueron descritos por Sánchez-González *et al.* (2013) al comparar películas obtenidas con NaCas, PG, HPMC y metilcelulosa.

Al parecer, las diferencias de empaquetamiento acontecidas durante el secado de los diferentes materiales, probablemente en combinación con sus diferentes caracteres hidrofílicos, tiene como resultado diferencias de retención de humedad.

Por otro lado, los resultados de la comparación de los valores de humedad de éstas películas con aquéllas que no contienen el ABC se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Contenido en humedad (g agua / 100 g película seca) de las distintas películas estudiadas con y sin ABC. Valores medios y desviaciones estándar entre paréntesis.

<b>Material</b>	<b>Humedad (g agua/100 g película seca). Películas sin ABC</b>	<b>Humedad (g agua/100 g película seca). Películas con ABC</b>
<b>AM</b>	9,4 (0,8) <sup>a1</sup>	8,9 (0,2) <sup>a12</sup>
<b>NaCas</b>	8,3 (0,5) <sup>a2</sup>	10,1 (0,6) <sup>b2</sup>
<b>HPMC</b>	5,0 (1,3) <sup>a3</sup>	4,4 (0,6) <sup>a3</sup>
<b>PG</b>	9,4 (0,5) <sup>a2</sup>	8,5 (1,7) <sup>a1</sup>

a-b: Diferentes superíndices dentro de la misma fila indican diferencias significativas para películas del mismo polímero con y sin ABC ( $p < 0,05$ ). 1-3: Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los distintos polímeros ( $p < 0,05$ ). ABC: agente de biocontrol HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa, PG: proteína de guisante, AM: Almidón de maíz, NaCas: caseinato de sodio

En la Tabla 4 se observa que la incorporación del ABC no tuvo ningún efecto significativo ( $p > 0,05$ ) sobre el contenido en humedad de las películas a excepción de las películas obtenidas con NaCas. El ligero pero significativo aumento de la humedad en estas últimas podría atribuirse a las discontinuidades en la matriz de la película debido a la presencia del ABC. Estas discontinuidades podrían propiciar que la matriz de la película fuera más abierta (Sánchez-González *et al.*, 2014) favoreciendo una mayor capacidad de retención de agua.

#### **4.1.2. Espesor**

Como puede observarse en la Tabla 3 en la que se presentan los valores de espesor medio de las películas equilibradas al 53% de humedad relativa, éstos fluctuaron entre de 46 y 62  $\mu\text{m}$ . Las películas a base NaCas presentaron espesores significativamente superiores a las demás películas, probablemente debido al empaquetamiento menos denso de la estructura micelar de la proteína y a efectos de humectación de la estructura.

Por otro lado, aunque no se encontraron diferencias significativas de espesor en los demás tipos de polímeros, en las matrices a base de polisacáridos se observó una tendencia hacia valores menores de espesor. Esto probablemente es debido a un mayor grado de empaquetamiento de las cadenas que dar lugar a estructuras más compactas, lo cual se traduce en menores espesores.

Por otro lado, los resultados de la comparación de los valores de espesor de estas películas con aquéllas que no contienen el ABC se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Valores de espesor de las distintas películas estudiadas con y sin ABC. Valores medios y desviaciones estándar entre paréntesis

Material	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	
	Películas sin ABC	Películas con ABC
AM	42 (4) <sup>a1</sup>	46 (2) <sup>a1</sup>
NaCas	62 (6) <sup>a1</sup>	62 (4) <sup>a2</sup>
HPMC	43,8 (0,7) <sup>a1</sup>	51 (2) <sup>b1</sup>
PG	48 (3) <sup>a1</sup>	50 (4) <sup>a1</sup>

a-b: Diferentes superíndices dentro de la misma fila indican diferencias significativas entre polímeros con y sin ABC ( $p < 0,05$ ). 1-3: Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los distintos polímeros ( $p < 0,05$ ). ABC: agente de biocontrol HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa, PG: proteína de guisante, AM: Almidón de maíz, NaCas: caseinato de sodio

En la Tabla 5 se observa que la incorporación del ABC solamente tuvo un efecto significativo sobre las películas de HPMC, que aumentaron significativamente su grosor. En el resto de casos el ABC se incorporó a la estructura de las películas sin producir efectos significativos sobre su espesor. Probablemente las interacciones específicas entre los polímeros y las membranas celulares durante el secado determinan la organización estructural de las películas con ABC, dando lugar a diferentes comportamientos en función del polímero utilizado.

#### **4.1.3. Permeabilidad al vapor de agua**

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es uno de los parámetros más importantes en la definición de la funcionalidad de las películas y recubrimientos comestibles y guarda una estrecha relación con su contenido en humedad. Esta propiedad cuantifica la efectividad de las películas frente al intercambio de humedad entre el alimento recubierto y su entorno. En general, son deseables valores bajos de PVA, con el fin de minimizar las pérdidas de peso en los productos recubiertos que afectan directamente a su calidad (Sánchez-González *et al.*, 2014).

La PVA se encuentra estrechamente relacionada con la humedad de las películas, así como con la microestructura de las mismas. En la Tabla 3 pueden observarse los valores de PVA obtenidos para las diferentes formulaciones. Por tratarse de matrices predominantemente hidrofílicas, presentan pobres propiedades barrera al vapor de agua en comparación con otros polímeros biodegradables (Fabra *et al.*, 2014). No obstante, se observó cierta influencia del tipo de polímero empleado sobre esta propiedad. Las películas obtenidas a base de HPMC presentaron las mejores propiedades barrera frente al vapor de agua ( $p < 0,05$ ), con unos valores similares a los obtenidos por Sánchez-González *et al.* (2011). La reducida permeabilidad al vapor de agua de estas películas podría ser en parte debido a su menor contenido en humedad, por lo que se encontrarían menos plastificadas que el resto y tendrían una estructura más compacta. Por el contrario, las películas obtenidas con NaCas presentaron los valores más altos de PVA, debido a la estructura más abierta de la matriz proteica, la cual facilitaría el paso de agua a través de las películas. Las películas de AM y PG no presentaron diferencias significativas entre ellas ( $p > 0,05$ ), situándose en valores intermedios.

Por otro lado, los resultados de la comparación de los valores de PVA de estas películas con aquéllas que no contienen el ABC se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6** .Valores de PVA( $\text{g/Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}\cdot 10^{11}$ ) de las distintas películas estudiadas con y sin ABC. Valores medios y desviaciones estándar entre paréntesis.

Material	PVA ( $\text{g/Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}\cdot 10^{11}$ )	
	Películas sin ABC	Películas con ABC
AM	121(7) <sup>a1</sup>	138(6) <sup>b1</sup>
NaCas	188(2) <sup>a2</sup>	175(4) <sup>a2</sup>
HPMC	74 (4) <sup>a3</sup>	80,6(1,7) <sup>b3</sup>
PG	171(5) <sup>a1</sup>	146(7) <sup>b1</sup>

a-b: Diferentes superíndices dentro de la misma fila indican diferencias significativas entre polímeros con y sin ABC ( $p < 0,05$ ). 1-3: Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los distintos polímeros ( $p < 0,05$ ). ABC: agente de biocontrol HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa, PG: proteína de guisante, AM: Almidón de maíz, NaCas: caseinato de sodio

La incorporación del ABC no afectó significativamente ( $p > 0,05$ ) a los valores de PVA en las películas de NaCas, mientras que las películas de AM, HPMC y PG sí que presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en función de la presencia de ABC. El efecto de la incorporación del ABC fue variable para diferentes matrices: se observó una disminución significativa en las películas de PG y un empeoramiento de las propiedades barrera en las películas de polisacáridos. Estos resultados son comparables con los de Sánchez-González *et al.* (2014),

donde se observó que la incorporación de *Lactobacillus sakei* o *Lactobacillus acidophilus* en películas a base de polisacáridos resultaron en un incremento significativo de su PVA. Según estos autores, la introducción de discontinuidades estructurales en la matriz polimérica debido a la presencia de microorganismos podría promover la transferencia de masa de las moléculas de agua a través de la película. Por el contrario, en las películas de PG, la incorporación de ABC causó una mejora de las propiedades barrera.

#### 4.1.4. Permeabilidad al oxígeno

Del mismo modo que para el resto de propiedades estudiadas, el tipo de polímero empleado tuvo un efecto significativo sobre las propiedades barrera al oxígeno de las películas. Los resultados de PO de las distintas películas con ABC se muestran en la Tabla 3. Las medidas correspondientes a las películas de HPMC no se pudieron obtener por ser superiores al límite de detección del equipo ( $200 \text{ cm}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ ). La matriz pura de AM presenta una muy baja PO, probablemente por la homogeneidad y compacidad de su estructura. Por el contrario, las películas de PG y NaCas, presentaron valores significativamente superiores de PO, probablemente debido de nuevo al menor empaquetamiento de la estructura proteica. La comparación de los valores de PO de estas películas con aquéllas que no contienen el ABC se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7** .Valores de PO( $\text{cm}^3\cdot\text{mm}/(\text{m}^2\cdot\text{atm}\cdot\text{día})$ ) de las distintas películas estudiadas con y sin ABC. Valores medios y desviaciones estándar entre paréntesis.

Material	PO ( $\text{cc}\cdot\text{mm}/(\text{m}^2\cdot\text{atm}\cdot\text{día})$ )	PO ( $\text{cc}\cdot\text{mm}/(\text{m}^2\cdot\text{atm}\cdot\text{día})$ )
	Películas sin ABC	Películas con ABC
AM	0,56 (0,05) <sup>a1</sup>	1,36(0,10) <sup>b1</sup>
NaCas	3,52 (0,05) <sup>a2</sup>	2,8 (0,3) <sup>b2</sup>
HPMC	>Id	>Id
PG	5,4 (0,7) <sup>a3</sup>	4,12 (0,04) <sup>b3</sup>

a-b: Diferentes superíndices dentro de la misma fila indican diferencias significativas entre polímeros con y sin ABC ( $p < 0,05$ ). 1-3: Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los distintos polímeros ( $p < 0,05$ ). >Id: superior al límite de detección. ABC: agente de biocontrol HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa, PG: proteína de guisante, AM: Almidón de maíz, NaCas: caseinato de sodio

En todos los casos hubo un efecto significativo de la incorporación de ABC sobre la permeabilidad al oxígeno de las películas ( $p < 0,05$ ), y este efecto fue en diferentes sentidos dependiendo de la naturaleza del polímero empleado. En el caso de AM la presencia del ABC

causó un aumento de la permeabilidad al oxígeno, mientras que para ambos tipos de proteína el efecto fue el contrario y la aplicación del ABC en las películas mejoró las propiedades barrera.

#### 4.1.5. Propiedades ópticas

El brillo es una de las propiedades ópticas más relevantes para determinar la idoneidad de películas como recubrimientos de alimentos, ya que tiene un impacto directo en la apariencia, así como sobre la aceptabilidad de los consumidores de los productos recubiertos (Aloui *et al.*, 2015).

El brillo de las películas está vinculado a la morfología superficial de las mismas (Sánchez-González *et al.*, 2010) de tal modo que, como tendencia general, cuanto más lisa sea la superficie, más brillante es la película. En la Tabla 3 se muestran los valores de brillo correspondientes a un ángulo de incidencia de 60°. Los valores obtenidos para brillo son inferiores a 70 unidades por lo que, en términos generales, pueden considerarse películas de poco brillo (Trezza y Krochta, 2000). Entre las películas con ABC incorporado, aquéllas de PG fueron las que presentaron más brillo, con valores comparables a los obtenidos por Sánchez-González *et al.* (2013), mientras que el resto de polímeros presentaron valores significativamente inferiores.

Por otro lado, la comparación de los valores de brillo de estas películas con aquéllas que no contienen el ABC se muestra en la Tabla 8.

**Tabla8.** Valores de brillo (60°) de las distintas películas estudiadas con y sin ABC. Valores medios y desviaciones estándar entre paréntesis.

Material	Brillo (60°)	Brillo (60°)
	Películas sin ABC	Películas con ABC
AM	46 (12) <sup>a1</sup>	15 (4) <sup>b1</sup>
NaCas	20 (8) <sup>a2</sup>	20 (7) <sup>a1</sup>
HPMC	56(9) <sup>a3</sup>	21 (8) <sup>b1</sup>
PG	52 (11) <sup>a4</sup>	42 (11) <sup>b2</sup>

a-b: Diferentes superíndices dentro de la misma fila indican diferencias significativas entre polímeros con y sin ABC ( $p < 0,05$ ). 1-4: Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre los distintos polímeros ( $p < 0,05$ ). ABC: agente de biocontrol HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa, PG: proteína de guisante, AM: Almidón de maíz, NaCas: caseinato de sodio

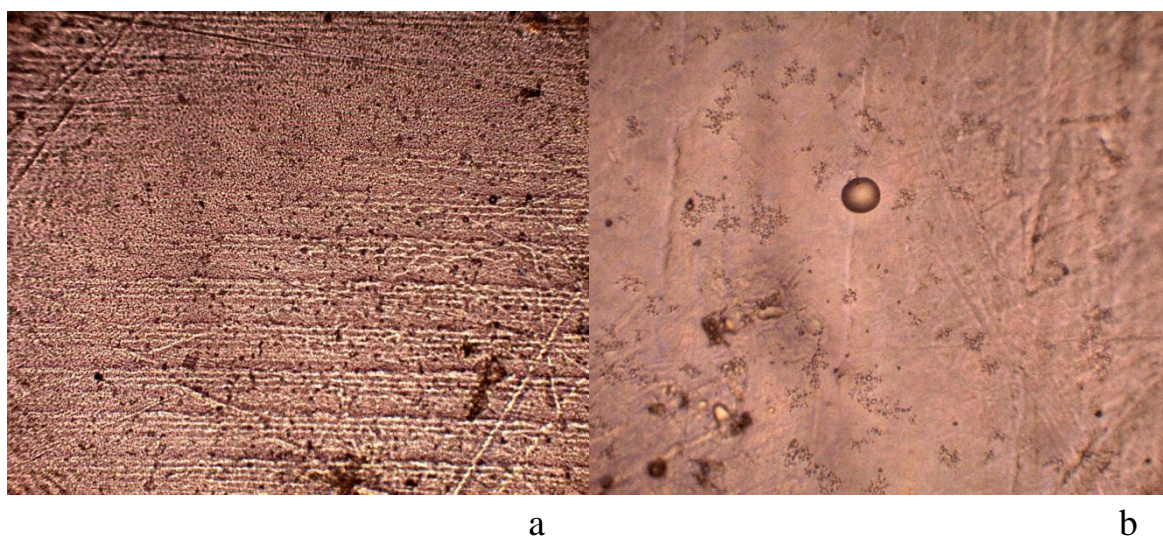


La incorporación del ABC tuvo como consecuencia una reducción significativa del brillo de las películas de polisacáridos y PG ( $p < 0,05$ ), mientras que no tuvo un efecto significativo en aquellas de NaCas ( $p > 0,05$ ). El efecto de la incorporación de ABC en el brillo de las películas es variable en la bibliografía. Aloui *et al.* (2015) no encontraron cambios significativos de esta variable al incorporar levaduras en películas de alginato sódico y goma de garrofín. En nuestro estudio, probablemente las células presentes en la superficie de las películas de polisacáridos aumentó la rugosidad superficial de las mismas, lo que tuvo como consecuencia una reducción significativa del brillo.

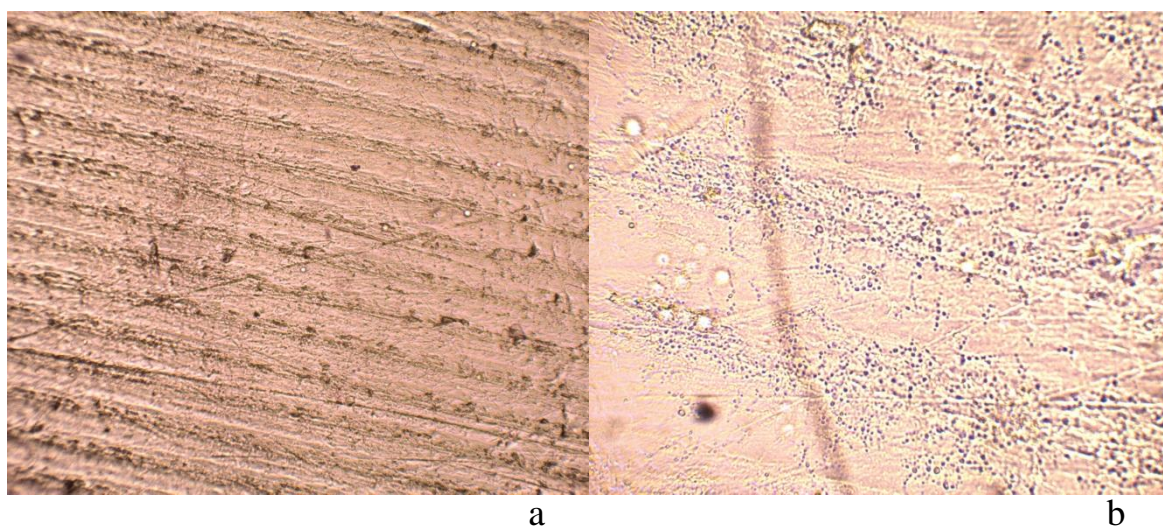
## **4.2. Propiedades estructurales de las películas con *Candida Sake***

El análisis microestructural de las películas proporciona información relevante acerca de la disposición de los componentes (matrices y ABCs), lo que, a su vez, permite explicar las diferencias en las propiedades barrera de las películas (Ortega-Toro *et al.*, 2014). En las figuras 1, 2, 3 y 4 se muestran las imágenes de las películas obtenidas con el microscopio óptico con el fin de estudiar su estructura y la disposición de las células de *Candida sake* en las mismas. En términos estructurales, se observa en todos los casos la aparición de zonas orientadas del material polimérico debido a la agregación de las cadenas después del secado. Con la resolución de la microscopía óptica, no se pueden apreciar diferencias claras entre biopolímeros.

En términos generales, pudo apreciarse que las células de *Candida sake* se distribuyeron de forma bastante homogénea en la matriz de los films. La mayor diferencia se observa para los films de almidón donde las células parecen estar distribuidas en forma de agregados, mientras en el resto de matrices lo hacen de forma más aislada. La tendencia a formar clústeres fue observada también cuando se aplicaron en forma de recubrimientos sobre uva (Marín *et al.*, 2016). En este caso la incorporación de tensoactivos a la formulación dio lugar a una mejor dispersión de las células. La agregación de las células y la formación de biofilms que las mantienen unidas podría ser una defensa natural de la levadura en aras a su supervivencia. Asimismo, es un mecanismo que diversos autores han sugerido como efectivo para que levaduras antagonistas ejerzan su acción frente a los patógenos (Giobbe *et al.*, 2007; Pu *et al.*, 2014).

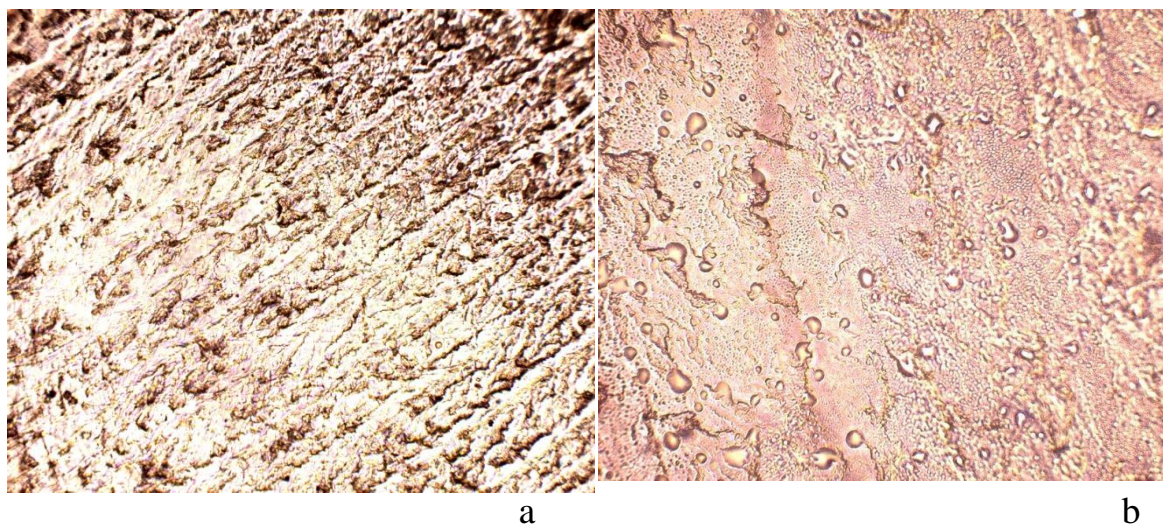


**Figura 1.** Imágenes de películas de almidón con *Candida sake* a 10x (a) y a 40x (b).

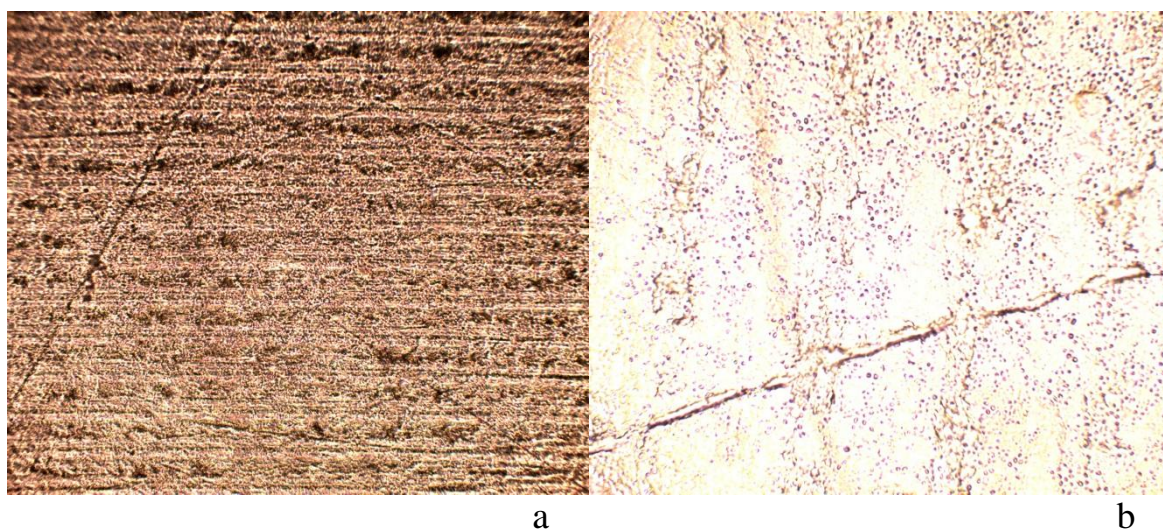


**Figura 2.** Imágenes de películas de caseinato sódico con *Candida sake* a 10x (a) y a 40x (b).





**Figura 3.** Imágenes de películas de HPMC con *Candida sake* a 10x (a) y a 40x (b).



**Figura 4.** Imágenes de películas de proteína de guisante con *Candida sake* a 10x (a) y a 40x (b).

## 5. Conclusiones

El tipo de biopolímero empleado tuvo un efecto significativo sobre las propiedades de las películas, lo cual estaría directamente relacionado con la estructura de las mismas. El grosor de las diferentes películas fue similar en todos los casos en coherencia con la misma densidad superficial de sólidos, aunque los films de caseinato fueron ligeramente más gruesos probablemente debido al empaquetamiento menos denso de la estructura micelar de la proteína. Las películas a base de HPMC fueron las que presentaron valores más bajos de humedad lo cual se tradujo en mejores propiedades barrera frente al vapor de agua, pero con los valores más altos de la permeabilidad al oxígeno. Las películas de caseinato fueron las que presentaron valores más altos de PVA mientras que los films de almidón y PG presentaron valores similares. Las películas de almidón presentaron las mejores propiedades de barrera frente al oxígeno, seguidos por los de caseinato. La incorporación de células disminuyó significativamente el brillo de los films, excepto en los de caseinato que fueron los menos brillantes. Con células los films más brillantes fueron los de PG.

La adición del ABC en algunos casos tuvo un efecto significativo sobre las propiedades de barrera de las películas. En general, aumentó ligeramente la PVA y la PO en las películas de polisacáridos y disminuyó estos valores en aquéllas de proteína. No obstante, las diferencias inducidas no son muy relevantes desde el punto de vista práctico, pudiéndose admitir que la incorporación de las células no introduce cambios notables en la funcionalidad de las películas estudiadas.

A pesar de lo anterior, sería necesario profundizar en el estudio de cómo las propiedades fisicoquímicas analizadas variarían con la adición del ABC cuando las dispersiones son aplicadas sobre la superficie de la fruta. Además, sería conveniente estudiar la aptitud de otros biopolímeros combinados con diferentes aditivos que confieran una mayor protección del antagonista.

## 6. Bibliografía

- Aloui, H., Licciardello, F., Khwaldia, K., Hamdi, M., Restuccia, C. (2015). Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 200, pp.22-30.
- Arrieta, M., Peltzer, M., Garrigós, M., Jiménez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114(4), pp.486-494.
- ASTM.(1995). Standard test methods for water vapor transmission of materials. Standard Designations: E96–95. In: Annual Book of American Society for Testing Materials, West Conshohocken, PA, USA.
- ASTM.(2002). Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using coulometric sensor. Standard designation D 3985-05. In Annual book of ASTM standards (pp. 472e477). Philadelphia: ASTM.
- Bautista-Rosales, P.U., Calderon-Santoyo, M., Servín-Villegas, R., Ochoa-Álvarez, N.A., Ragazzo-Sánchez, J.A. (2013). Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biol. Control* 65, 293-301.
- Bull, C., Stack, J., Smilanick, J. (1997). *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biological Control*, 8(1), pp.81-88.
- Calvo-Garrido, C., Elmer, P., Viñas, I., Usall, J., Bartra, E., Teixidó, N. (2013). Biological control of botrytis bunch rot in organic wine grapes with the yeast antagonist *Candida sake* CPA-1. *Plant Pathology*, 62(3), pp.510-519.
- Calvo-Garrido, C., Viñas, I., Usall, J., Rodríguez-Romera, M., Ramos, M., Teixidó, N. (2014). Survival of the biological control agent *Candida sake* CPA-1 on grapes under the influence of abiotic factors. *J Appl Microbiol*, 117(3), pp.800-811.

- Cañamás, T., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Anguera, M., Teixidó, N. (2008). Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 part II. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1), pp.96-106.
- Cañamás, T., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Solsona, C., Teixidó, N. (2011). Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological Control*, 56(2), pp.150-158.
- Chand-Goyal, T., Spotts, R. (1997). Biological Control of Postharvest Diseases of Apple and Pear under Semi-commercial and Commercial Conditions Using Three Saprophytic Yeasts. *Biological Control*, 10(3), pp.199-206.
- Choi, W.S., Han, J.H. (2001). Physical and mechanical properties of pea-protein-based edible films. *Journal of Food Science*, 66(2), pp.319-322.
- Choi, W.S., Han, J.H. (2002). Film-forming mechanism and heat denaturation effects on the physical and chemical properties of pea-protein-isolate edible films. *Journal of Food Science*, 67, 1399–1406.
- Droby, S., Wisniewski, M., El Ghaouth, A., Wilson, C. (2003). Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biology and Technology*, 27(2), pp.127-135.
- El-Ghaouth, A., Wilson, C., Wisniewski, M. (1998). Ultrastructural and cytochemical aspects of the Biological Control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology*, 88(4), pp.282-291.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Wisniewski, M., Wilson, C.L. (2000a). Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Plant Dis.* 84, 249-253.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Brown, G.E., Ippolito, A., Wisniewski, M., Wilson, C.L. (2000b). Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Dis.* 84(3), 243-248.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J., Brown, G., Ippolito, A., Wilson, C. (2001). Control of decay of apple and citrus fruits in semicommercial tests with *Candida saitoana* and 2-Deoxy-d-glucose. *Biological Control*, 20(2), pp.96-101.

- Elmer, P., Reglinski, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55(2), pp.155-177.
- Emmert J., E. A. B., Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a gram-positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171, 1–9.
- Fabra, M., Talens, P., Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85(3), pp.393-400.
- Fabra, M. J., López-Rubio, A., Lagaron, J. M. (2014). Biopolymers for food packaging applications. *Smart polymers and their applications*, 15, 476-509. Woodhead Publishing.
- Fan, Q., Tian, S.P. (2000). Postharvest biological control of *Rizhopus* rot on nectarine fruit by *Pichia membranefaciens*. *Plant Dis.* 84, 1212-1216.
- Fan, Y., Xu, Y., Wang, D., Zhang, L., Sun, J., Sun, L., Zhang, B. (2009). Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria×ananassa*) preservation quality. *Postharvest Biology and Technology*, 53(1-2), pp.84-90.
- Filonow, A., Vishniac, H., Anderson, J., Janisiewicz, W. (1996). Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biological Control*, 7(2), pp.212-220.
- Gialamas, H., Zinoviadou, K., Biliaderis, C., Koutsoumanis, K. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43(10), pp.2402-2408.
- Giobbe, S., Marceddu, S., Scherm, B., Zara, G., Mazzarello, V. L., Budroni, M., Migheli, Q. (2007). The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Research*, 7(8), 1389–1398.
- Hurley, R., de Louvois, J., Mulhall, A. (1987). Yeast and human and animal pathogens. In A. H. Rose & J. S. Harrison (Eds.), *The Yeasts*, Vol. 1 (pp. 207–281). New York (US): Academic Press.

- Janisiewicz, W. J. (1994). Enhancement of biocontrol of blue mold with nutrient analog 2-deoxy-D-glucose on apples and pears. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2671–2676.
- Janisiewicz, W. J. (1998). Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits: Challenges and opportunities. *Plant–Microbe Interactions and Biological Control* (J. Boland and L. D. Kuykendall, Eds.), pp. 171–198. Dekker, New York.
- Jiménez, A., Fabra, M., Talens, P., Chiralt, A. (2010). Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), pp.585-593.
- Jiménez, A., Fabra, M., Talens, P., Chiralt, A. (2012). Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 26(1), pp.302-310.
- Kowalczyk, D., Baraniak, B. (2011). Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. *Journal of Food Engineering*, 105(2), pp.295-305.
- Lima, G., Curtis, F.D., Spina, A.M., Cicco, V.D. (2002) Survival and activity of biocontrol yeasts against powdery mildew of cucurbits in the field. *Bull OILB/SROP* 25, 187–190.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153–160.
- Longa, C., Elad, Y., Pertot, I. (2007) Survival of *Trichoderma atroviride* 122F on strawberry phylloplane and in soil. *Bull OILB/SROP* 30, 297–302.
- López de Lacey, A., López-Caballero, M., Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M., Montero, P. (2012). Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, pp.277-282.
- Manso, T., Nunes, C. (2011). *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biol. Technol.* 61, 64-71.



- Marín, A., Cháfer, M., Atarés, L., Chiralt, A., Torres, R., Usall, J., Teixidó, N. (2016). Effect of different coating-forming agents on the efficacy of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* on grapes. *Biological Control*, 96, pp.108-119.
- Masih, E. I., & Paul, B. (2002). Secretion of  $\beta$ -1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranaefaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. *Current Microbiology*, 44(6), 391–395.
- McGuire, R. G., Baldwin, E. A. (1994). Compositions of cellulose coatings affect populations of yeasts in the liquid formulation and on coated grapefruits. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 107, 293–297.
- McGuire, R. and Dimitroglou, D. (1999). Evaluation of Shellac and Sucrose Ester Fruit Coating Formulations that Support Biological Control of Post-harvest Grapefruit Decay. *Biocontrol Science and Technology*, 9(1), pp.53-65.
- McGuire, R. (2000). Population dynamics of postharvest decay antagonists growing epiphytically and within wounds on grapefruit. *Phytopathology*, 90(11), pp.1217-1223.
- McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R., Krochta, J. M. (1993).Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4), 899–903.
- Nunes, C. A. (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 181–196.
- Ortega-Toro, R., Jiménez, A., Talens, P., Chiralt, A. (2014) Effect of the incorporation of surfactants on the physical properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids* 38, 66-75.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C. and Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, 47, pp.85-92.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2010). Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), pp.1174-1183.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Marcilla, A., Chiralt, A., Cháfer, M., González-Martínez, C. (2011). Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropylmethylcellulose

- edible coatings containing propolis extract. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1), pp.64-70.
- Pérez-Gago, M., Krochta, J. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *J. Agric. Food Chem.*, 49(2), pp.996-1002.
- Platania, C., Restuccia, C., Muccilli, S., Cirvilleri, G. (2012). Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). *Food Microbiol.* 30, 219-225.
- Potjewijd, R., Nisperos, M. O., Burns, J. K., Parish, M., Baldwin, E. A. (1995). Cellulose-based coatings as carriers for *Candida guilliermondii* and *Debaryomyces sp.* in reducing decay of oranges. *HortScience*, 30(7), 1417–1421.
- Pu, L., Jingfan, F., Kai, C., Chao-an, L., Yunjiang, C. (2014). Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckeraapiculata* for the control of blue mold on citrus. *FEMS Yeast Research*, 14(4), 536–546.
- Qin, X., Xiao, H., Xue, C., Yu, Z., Yang, R., Cai, Z., Si, L. (2015). Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 160–167.
- Raspor, P., Miklič-Milek, D., Avbelj, M., Čadež, N. (2010). Biocontrol of grey mould disease on grape caused by *Botrytis cinerea* with autochthonous wine yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 336–343.
- Restuccia, C., Giusino, F., Licciardello, F., Randazzo, C., Caggia, C., Muratore, G. (2006). Biological control of peach fungal pathogens by commercial products and indigenous yeasts. *J. Food Prot.* 69, 2465-2470.
- Roberts, R. (1990). Postharvest Biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*, 80(6), p.526.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., Maté, J. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39(8), pp.840-846.

- Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., Gómez-Zavaglia, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 560–566.
- Rosa-Magri, M., Tauk-Tornisielo, S., Ceccato-Antonini, S. (2011) Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. Brazilian Archives of *Biology and Technology*, 54(1), pp.1-5.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23(8), pp.2102-2109.
- Sánchez-González, L., Chiralt, A., González-Martínez, C., Cháfer, M. (2011) Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *Journal of Food Engineering* 105, 246–253.
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J., Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 92-98.
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I., Chiralt, A. (2014). Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria. *Food Control*, 35(1), 200–206.
- Sharma, R. R., Singh, D., Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3), 205–221.
- Teixidó, N., Usall, J., Gutierrez, O., Viñas, I. (1998). Effect of the antagonist *Candida sake* on apple surface microflora during cold and ambient (shelf life) storage. *Plant Pathology* 104, 387-398.
- Torres, R., Teixido, N., Viñas, I., (2006). Efficacy of *Candida sake* CPA-1 formulation in controlling *Penicillium expansum* decay on pome fruit from different Mediterranean regions. *Journal of Food Protection* 69, 2703–11.
- Trezza, T. and Krochta, J. (2000). The Gloss of Edible Coatings as Affected by Surfactants, Lipids, Relative Humidity, and Time. *Journal of Food Science*, 65(4), pp.658-662.

- Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I. (2000). Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 83–92.
- Vargas, M., Garrido, F., Zapata, N., Tapia, M. (2012). Isolation and selection of epiphytic yeasts for biocontrol of *Botrytis cinerea* on table grapes. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(3), 332–337.
- Villalobos, R., Hernández-Muñoz, P., Chiralt, A. (2005). Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 20(4), pp.502-509.
- Villalobos-Carvajal, R., Hernández-Muñoz, P., Albors, A., Chiralt, A. (2009). Barrier and optical properties of edible hydroxypropyl methylcellulose coatings containing surfactants applied to fresh cut carrot slices. *Food Hydrocolloids*, 23(2), pp.526-535.
- Wang, Y., Yu, T., Xia, J., Yu, D., Wang, J., Zheng, X. (2010). Biocontrol of postharvest gray mold of cherry tomatoes with the marine yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *Biol. Control* 53, 178-182.
- Wang, Y., Tang, F., Xia, J., Yu, T., Wang, J., Azhiti, R., Zheng, X. (2011). A combination of marine yeast and food additive enhances preventive effects on postharvest decay of jujubes (*Zizyphus jujuba*). *Food Chemistry*, 125(3), pp.835-840.
- Wilson, C. L., Wisniewski, M. E. (1994). Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables—Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., Schena, L., Daus, A., Kaplunov, T., Zutkhi, J., Ben-Arie, R., Droby, S. (2000). Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology*, 20(2), pp.115-124.
- Zúñiga, R., Skurtys, O., Osorio, F., Aguilera, J., Pedreschi, F. (2012). Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methylcellulose films: Effect of their microstructure. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), pp.1147-1158.